



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**INSTITUTO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

# **MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

## **Trabajo Fin de Máster**

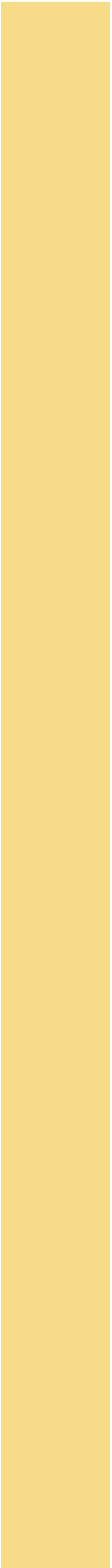
**Efectos de los ureidos y de la fijación simbiótica de  
nitrógeno en la tolerancia a la sequía en plantas de  
judía**

**Cristina M<sup>a</sup> López Vázquez**  
**Dpto. Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal**

**Director: Manuel Pineda Priego**  
(Doctor y Profesor del Máster)

**Directora: Josefa Muñoz Alamillo**

**Córdoba, Junio/2017**



Manuel Pineda Priego y Josefa Muñoz Alamillo, directores del Trabajo de Fin de Máster titulado: "Efecto de los ureidos y de la fijación simbiótica de nitrógeno en la tolerancia a la sequía en plantas de judía", llevado a cabo por la Graduada Dña. Cristina María López Vázquez, proponen como evaluadores externos de este trabajo a los siguientes Profesores:

Titular:

Miguel Aguilar Urbano (bb2aguim@uco.es)

Suplentes:

Purificación Cabello de la Haba (bv1cahap@uco.es)

Eloisa Agüera Buendia (vg1agbue@uco.es)

Firmado en Córdoba a 29 de junio de 2017

Manuel Pineda Priego

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Pineda', with a long horizontal stroke underneath.

Josefa Muñoz Alamillo

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'J' followed by a horizontal line.

## Índice general

Índice de figuras .....	3
Índice de tablas. ....	3
Resumen .....	5
I. Introducción .....	6
1. Importancia de las leguminosas en la sociedad y el medio ambiente .....	6
2. Asimilación del nitrógeno.....	7
3. Leguminosas ureídicas .....	7
4. Papel de los ureidos durante el estrés hídrico .....	8
5. Síntesis de ácido abscísico y su papel durante el estrés hídrico.....	8
6. Hipótesis del trabajo .....	10
II. Objetivos	11
III. Materiales y métodos .....	12
1. Material biológico, condiciones de cultivo y recogida de muestras.....	12
1.1. Material vegetal	12
1.2. Condiciones de cultivo .....	12
1.3. Recogida y tratamiento de muestras.....	13
2. Análisis fisiológico.....	13
2.1. Determinación de la biomasa de raíz y parte aérea .....	13
2.2. Determinación del contenido hídrico relativo (RWC) en hojas .....	14
3. Determinación de ureidos totales .....	14
3.1. Obtención de extracto vegetal .....	14
3.2. Determinación de ureidos totales .....	14
3.3. Obtención de la recta de calibrado.....	15
3.4. Determinación del contenido en proteína soluble mediante el método de Bradford .....	15

4. Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos.....	16
4.1. Extracción de ARN total.....	16
4.2. Cuantificación y análisis de la pureza de los ácidos nucleicos.....	16
4.3. Electroforesis del ARN aislado .....	17
5. Análisis de la expresión génica .....	17
5.1. Tratamiento con ADNasa .....	17
5.2. Síntesis de ADNc .....	17
5.3. PCR del gen de la Actina .....	18
5.4. PCR semicuantitativa .....	18
5.5. PCR cuantitativa .....	19
6. Análisis estadísticos .....	20
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>21</b>
1. Efecto sobre los parámetros fisiológicos del déficit hídrico en plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno o fertilizadas con nitrato.....	21
1.1. Determinación de la biomasa de raíz y parte aérea .....	22
1.2. Análisis del contenido relativo de agua (RWC) en hojas .....	23
2. Determinación de ureidos totales.....	24
3. Análisis de la expresión génica .....	24
3.1. Análisis de la expresión relativa de genes relacionados con la síntesis de ureidos.....	24
3.2. Análisis de expresión por PCR semicuantitativa de genes <i>PvNCED</i> en hojas.....	25
3.3. Análisis de expresión relativa de genes relacionados con la expresión de ABA .....	27
<b>V. Discusión</b>	<b>28</b>
<b>VI. Conclusiones .....</b>	<b>33</b>
<b>VII. Bibliografía .....</b>	<b>34</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ruta de biosíntesis de ácido abscísico.....	9
<b>Figura 2.</b> Contenido hídrico del suelo (SWC) .....	21
<b>Figura 3.</b> Determinación de la biomasa de raíz y parte aérea .....	22
<b>Figura 4.</b> Análisis del contenido relativo de agua (RWC) en hojas .....	23
<b>Figura 5.</b> Determinación de ureidos totales en 4ª hoja trifoliada de plantas de <i>P. vulgaris</i> .....	24
<b>Figura 6.</b> Expresión relativa de genes implicados en las rutas de biosíntesis de ureidos en plantas de <i>P. vulgaris</i> .....	25
<b>Figura 7.</b> Análisis de la expresión de genes <i>PvNCED</i> de <i>P. vulgaris</i> .....	26
<b>Figura 8.</b> Expresión relativa de genes relacionados con la expresión de ABA en plantas de <i>P. vulgaris</i> .....	27

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones conocidas de la recta de calibrado de alantoína .....	15
<b>Tabla 2.</b> Lista de cebadores utilizados en la PCR de actina.....	18
<b>Tabla 3.</b> Lista de cebadores utilizados en la PCR semicuantitativa .....	19
<b>Tabla 4.</b> Lista de cebadores utilizados para la qPCR.....	20



## RESUMEN

Los ureidos se acumulan de forma natural en leguminosas fijadoras de  $N_2$ , pero no en leguminosas cultivadas con nitrato. Sin embargo, en estas últimas sí se acumulan bajo condiciones de estrés hídrico. Una mayor acumulación de ureidos se ha relacionado con la sensibilidad a la sequía y la inhibición de la fijación de  $N_2$ . Sin embargo, los ureidos podrían ejercer un papel protector frente a la sequía por medio de la regulación de la síntesis de ácido abscísico (ABA), el cual a su vez regula las cascadas de transducción de señales de resistencia al estrés hídrico. En este trabajo se ha analizado la influencia del estrés hídrico en la regulación de síntesis de ABA y ureidos en plantas cultivadas en condiciones de fijación simbiótica de  $N_2$  o con 10mM de nitrato. Además, se ha investigado cuál es el origen de los ureidos que se acumulan durante la sequía en plantas de nitrato. Se determinó la pérdida de agua en el tejido foliar y la biomasa de raíz y parte aérea en plantas control y en sequía. También se estudió la regulación de la síntesis de ureidos y ABA a nivel transcripcional, mediante qPCR de los genes implicados directamente en sus rutas de biosíntesis. Los resultados reflejaron que, al contrario que en plantas con nitrato, las plantas fijadoras no sufrían una pérdida de contenido hídrico foliar ni de biomasa durante la sequía y tenían una mayor expresión del gen *PvNCED3*, relacionado con la síntesis de ABA, bajo condiciones control.



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Importancia socioeconómica y medioambiental de la judía común (*Phaseolus vulgaris*)

La judía común (*Phaseolus vulgaris*) pertenece a la familia de las leguminosas (*Leguminosae*), que tiene unas 17.000 especies, de las que muchas se usan en alimentación humana y animal. La importancia de las leguminosas en agricultura solo es superada por las gramíneas (*Poaceae*). Su cultivo se da fundamentalmente en la región ecuatorial y supone un 27% de la producción vegetal global (Graham y Vance, 2003). En concreto, el cultivo de judía común se concentra mayoritariamente en América Latina, mientras que en Europa y el norte de África se encuentra restringido a las zonas circundantes del Mediterráneo (Beebe *et al.*, 2013). A pesar de esto, dicha especie es considerada la leguminosa más importante para el consumo humano (Brought *et al.*, 2003).

Dependiendo de su uso, las leguminosas cultivadas se pueden clasificar en leguminosas forrajeras y leguminosas de grano. Dentro de las leguminosas de grano, encontramos especies como la lenteja (*Lens culinaris*), el garbanzo (*Cicera rietinum*), la judía (*Phaseolus vulgaris*) y la soja (*Glycine max*). Estas proporcionan, al ser humano, el 33% del nitrógeno en forma de proteína a través de la dieta (Beebe, 2012; Broughton *et al.*, 2003; Graham y Vance, 2003). Pero su importancia no es solo dietética. Las leguminosas establecen relaciones simbióticas con hongos, formando micorrizas que favorecen la captación de P y N, y con bacterias denominadas rizobios, que forman nódulos que captan y fijan el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>). Esto genera un aporte del 30% de N en el suelo, para la próxima temporada de cultivos, lo que ayuda a disminuir la dependencia del uso de fertilizantes (Brockwell *et al.*, 1995; Sprent, 2002). Además, no solo mejoran la fertilidad del suelo, sino que también moderan las condiciones adversas que pueda presentar el ecosistema en el que se encuentran (Gentzbittel *et al.*, 2015).

## 2. Asimilación del nitrógeno

El nitrógeno es uno de los elementos químicos más abundantes en la materia viva, presente en los aminoácidos, ácidos nucleicos y en otras muchas biomoléculas.

Para las plantas, la disponibilidad de nitrógeno es el factor más limitante de su crecimiento y reproducción. Captan el nitrógeno del suelo principalmente en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Pero cuando hay escasez de nitrógeno inorgánico en el suelo, unas pocas plantas tienen la capacidad de captar el nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ). Para ello establecen una asociación simbiótica con bacterias del suelo, denominadas rizobios. La interacción de los rizobios con la raíz de la planta induce la formación de nódulos. En los nódulos los rizobios captan y reducen el nitrógeno atmosférico, que es aprovechado por la planta. Aunque puede darse en varias familias de plantas, este hecho ocurre principalmente en leguminosas (Sprent, 2002).

Tanto tras la asimilación del nitrato como en la simbiosis con rizobios, el nitrógeno es reducido hasta amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). En la asimilación del nitrato, este es reducido hasta amonio por medio de dos reacciones consecutivas catalizadas por las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR), y requieren 8 electrones aportados por el NADH. Todo el poder reductor necesario se forma a partir de las reacciones lumínicas de la fotosíntesis, así como de la glucólisis y la respiración. En cambio, en la fijación del nitrógeno atmosférico que llevan a cabo los rizobios en los nódulos, el  $\text{N}_2$  es reducido hasta  $\text{NH}_4^+$  gracias al complejo enzimático nitrogenasa, exclusivo de procariotas. La energía necesaria para la reacción de la nitrogenasa proviene de respiración en los nódulos, con un elevado consumo de carbohidratos, procedentes de la planta.

## 3. Leguminosas ureídicas

Una vez formado el  $\text{NH}_4^+$ , este es rápidamente asimilado por el ciclo GS-GOGAT en forma de glutamina (Gln). La glutamina por su parte servirá para la síntesis de los compuestos orgánicos nitrogenados que se transportan al resto de la planta. Dependiendo de los compuestos nitrogenados derivados de la fijación del  $\text{N}_2$  las leguminosas pueden clasificarse en leguminosas amídicas, como el guisante (*Pisum*

*sativum*) y leguminosas ureídicas, como la judía (*P. vulgaris*). Las leguminosas amídicas transportan el nitrógeno fijado en forma de asparragina y glutamina. Mientras que las leguminosas ureídicas lo hacen en forma de ureidos (alantoína y alantoato), generados a partir de los nucleótidos de purina (Atkins, 1991; Todd *et al.*, 2006; Zrenner *et al.*, 2006). Sin embargo, los ureidos solo predominan cuando las leguminosas se encuentran fijando el nitrógeno atmosférico. Al aportarles nitrato, el nitrógeno asimilado pasa a formar parte de los aminoácidos glutamina y asparragina, como ocurre en las plantas amídicas (McClure e Israel, 1979; Pate *et al.*, 1980).

#### **4. Papel de los ureidos durante el estrés hídrico**

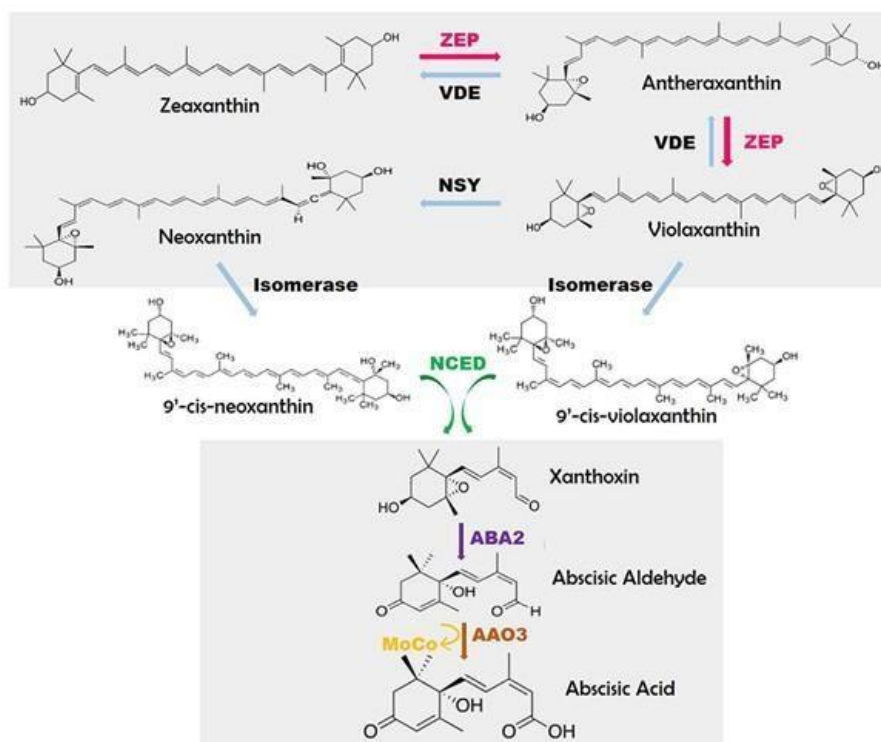
Se ha comprobado que, durante la sequía, en los genotipos de soja más sensibles al estrés hídrico hay mayor acumulación de ureidos que en ausencia del estrés, o que en los genotipos más tolerantes (King y Purcell, 2001). Diversos estudios sugieren que esta acumulación está asociada con la inhibición en la fijación de  $N_2$  y con la sensibilidad a la sequía. Por tanto, una baja concentración de ureidos durante la sequía en plantas noduladas parece prolongar la fijación de  $N_2$  y la tolerancia a la sequía (King y Purcell, 2005; Purcell *et al.*, 2000; Serraj *et al.*, 1999, 2001; Vadez *et al.*, 2000). Sin embargo, otros estudios han relacionado los ureidos con la protección frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por diferentes situaciones de estrés (Brychkova *et al.*, 2008; Nakagawa *et al.*, 2007). El estrés hídrico también provoca acumulación de ureidos en los cultivares más sensibles de plantas de judía (Coletto *et al.*, 2014), y se ha sugerido que el ácido abscísico (ABA) tiene un papel inductor en la acumulación de ureidos (Alamillo *et al.*, 2010).

#### **5. Síntesis de ácido abscísico y su papel durante el estrés hídrico**

Las plantas ponen en marcha diversos mecanismos durante el estrés hídrico que ayuden a paliar los efectos del déficit de agua, entre ellos podría incluirse la acumulación de ureidos. En respuesta al estrés se ponen en marcha cascadas de transducción de señales que inducen la expresión de un gran número de genes. Estas rutas pueden ser dependientes o independientes del ABA. Este es considerado como la “hormona del estrés” ya que responde a multitud de situaciones de estrés, tanto

bióticos como abióticos, pero sobre todo al estrés hídrico u osmótico (Zhang D., 2014). El ABA se sintetiza *de novo* en los cloroplastos, en respuesta a la deshidratación. Por el contrario, la rehidratación induce su degradación (Roychoudhury *et al.*, 2013). Entre las enzimas que intervienen en la biosíntesis de ABA está la 9-cis epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), cuya expresión se induce por sequía y por diversos tipos de estrés (Tuteja, 2007).

El ABA participa en multitud de mecanismos para la protección de la planta frente a la sequía. Entre estos mecanismos está el cierre estomático (Farquhar y Sharkey, 1982). Durante la sequía, el cierre estomático actúa como una respuesta temprana que permite a la planta mantener un balance hídrico favorable, amortiguando así la caída del potencial hídrico del xilema (Jones y Sutherland, 1991).



**Fig. 1. Ruta de biosíntesis de ácido abscísico (Vishwakarma K. *et al.*, 2017).** Abreviaturas: Zeaxantina oxigenasa (ZEP); Violaxantina depoxidasa (VDE); Neoxantisa sintasa (NSY); 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED); Deshidrogenasa de alcohol (ABA2); Abscísico Aldehído Oxidasa (AAO3) y cofactor de molibdeno (MoCo).

Además del cierre estomático, como ya se ha dicho, el ABA desencadena la activación de cascadas de transducción de señales. En *Arabidopsis*, estas cascadas inducen la expresión de diferentes genes entre ellos están los factores de transcripción MYC y MYB (Abe *et al.*, 1997). Se ha demostrado que dichos factores de transcripción

juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica en tejidos vegetativos bajo condiciones de estrés hídrico, controlando muchas de las respuestas a ese estrés (Abe *et al.*, 1997).

## **6. Hipótesis del trabajo**

La hipótesis de este trabajo es que las plantas de judía cultivadas bajo condiciones de fijación de N<sub>2</sub> deberían ser más tolerantes al estrés hídrico y que esta tolerancia estaría mediada por los ureidos que se sintetizan naturalmente en estas plantas a partir del nitrógeno fijado en los nódulos, y que los ureidos ejercerían su papel protector a través de la regulación de la síntesis de ABA que regula diversos mecanismos de resistencia al estrés.

## II. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es determinar si la fijación de N<sub>2</sub> atmosférico regula la síntesis de ABA. Se pretende también investigar cuál es el origen de los ureidos acumulados durante la sequía tanto en las plantas en simbiosis como en las fertilizadas con nitrato.

Para ello se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. determinación de la biomasa de la planta y del contenido hídrico relativo (RWC) de hojas, de plantas cultivadas en condiciones de fijación de N<sub>2</sub> atmosférico y plantas con aporte de nitrato sometidas a sequía durante 7 y 14 días.
2. Análisis de la concentración de ureidos en el tejido foliar de plantas fijadoras de N<sub>2</sub> y plantas con nitrato sometidas a sequía.
3. Análisis de expresión a nivel transcripcional de los genes *PvXDH*, *PvPRAT3* y *PvHGPT*, relacionados con las rutas de síntesis de ureidos, en plantas fijadoras y con nitrato sometidas a sequía.
4. Análisis de expresión a nivel transcripcional de los genes *PvNCED* y *PvMYC*, relacionados con la síntesis de ABA y la respuesta dependiente de ABA respectivamente, en plantas fijadoras y con nitrato sometidas a sequía.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Material biológico, condiciones de cultivo y recogida de muestras

##### 1.1. Material vegetal

Los experimentos se realizaron con semillas de judía común (*Phaseolous vulgaris* L.) del cultivar comercial "Matterhorn" (PHB-0220).

##### 1.2. Condiciones de cultivo

Las semillas se esterilizaron antes de la germinación. Para ello, dichas semillas se lavaron con etanol (30 segundos), con hipoclorito sódico al 5% (v/v) (5 minutos) y después se les dieron 5-6 lavados con agua destilada estéril. Una vez esterilizadas, se incubaron en placas de Petri con papel de filtro húmedo a 26 °C durante 72 horas (imbibición).

Tras la germinación, se sembraron 3 semillas por maceta en una mezcla de perlita y vermiculita (2/3, v/v). Las plantas se cultivaron en cámara de cultivo, con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 26 °C y 8 horas de oscuridad a 21-19 °C, una intensidad lumínica de 200 - 300  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y una humedad relativa del 70%. Las plantas que se cultivaron en condiciones de fijación de nitrógeno atmosférico se inocularon con un cultivo líquido fresco (1-2 ml/planta) de *Rhizobium leguminosarum* (cepa ISP 14) en el momento de la siembra, y se reinocularon con la misma cepa 7 días después de la siembra. De este grupo, la mitad de las plantas se regaron 3 veces/semana durante todo el experimento con una solución que contenía 25ml/L de macronutrientes y 1ml/L de micronutrientes, excepto el primer día de riego que se realizó con un medio que contenía 5ml/L de  $\text{KNO}_3$  1M como fuente de nitrógeno. Estas serían las macetas control. La otra mitad de las plantas se trató bajo las mismas condiciones que las anteriores, hasta los 21 o 28 días, momento en el que dejaron de regarse durante 7 o 14 días. Estas plantas constituirían el grupo de sequía de fijación. Para las plantas fertilizadas con nitrato, las macetas no se inocularon, sino que se regaron con un medio provisto de 25ml/L de macronutrientes, 1ml/L de micronutrientes y  $\text{KNO}_3$  10mM. De nuevo, las macetas control se regaron regularmente y las macetas restantes se dejaron de regar durante 7 o 14 días, a los 21 días desde la siembra (plantas jóvenes) o a los 28 días de crecimiento.

**Solución de macronutrientes:** 0,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 g/L de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 2g/L de  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g/L de  $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 0,2 g/L de Sandofer (quelato de Fe).

**Solución de micronutrientes:** 2,86 g/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2,08 g/L de  $\text{SO}_4\text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,22 g/L de  $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,08 g/L de  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 0,15 g/L de  $\text{MoO}_4\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

Durante el crecimiento de las plantas, se realizó la determinación gravimétrica de la retención de agua del suelo (contenido hídrico del suelo, SWC) siguiendo el método descrito por Charlson *et al.* (2009). Para ello, el primer día de siembra, las macetas se regaron en exceso y se drenó el exceso de agua. A continuación, se pesaron y se estimó el 100% de SWC. Una vez empezados los tratamientos de sequía, las macetas control y las tratadas se pesaron regularmente hasta el día de recogida de muestras.

### 1.3. *Recogida y tratamiento de muestras*

Transcurrido el tiempo indicado se recogieron y analizaron las muestras de las macetas control (riego) y de 7 y 14 días en sequía, tanto de las condiciones en fijación de nitrógeno atmosférico como en las de aporte de nitrato 10mM. En todos los casos el tejido vegetal recolectado fue: 3ª y 4ª hoja trifoliada (hojas) y raíces, nódulos (de las plantas en fijación) y el resto de la parte aérea. De todas las muestras recogidas, las de 4ª hoja trifoliada y una pequeña cantidad de raíz se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se almacenaron en un congelador a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Finalmente, las muestras congeladas se trituraron en un mortero de porcelana hasta que se consiguió un fino polvo. Durante este proceso se añadió constantemente nitrógeno líquido para evitar que la muestra se descongelase.

## 2. **Análisis fisiológico**

### 2.1. *Determinación de la biomasa de raíz y parte aérea*

Se analizó el efecto del tratamiento sobre la biomasa de la raíz y la parte aérea de cada planta. Para ello, justo después de la recolección de los tejidos de plantas control y tratadas, se determinó el peso fresco (FW) de los mismos. Después, se incubaron en una estufa a  $75^\circ\text{C}$  durante 72 horas y se volvieron a pesar, obteniendo el peso seco (DW).



## 2.2. *Determinación del contenido hídrico relativo (RWC) en hojas*

También, se determinó el contenido relativo hídrico (RWC) en muestras de 3ª hoja trifoliada siguiendo el método descrito por Barrs y Weatherly (1962). Para ello, los tejidos de hoja se pesaron inmediatamente después del muestreo, obteniendo así el peso fresco (FW). A continuación, se empaparon en agua destilada y se incubaron durante la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo necesario se volvieron a pesar y se obtuvo el peso de máxima turgencia (TW). Después, se dejaron secar durante 24 horas a 75°C y se volvieron a pesar para obtener el peso seco (DW). El RWC se calculó usando la siguiente fórmula:

$$RWC = ((FW - DW) / (TW - DW)) \times 100$$

## 3. **Determinación de ureidos totales**

La determinación de los ureidos totales se llevó a cabo realizando el ensayo colorimétrico descrito por Vogels y Van Der Drift (1970), basado en la transformación físico-química de cada uno de los ureidos hasta glioxilato. En presencia de un medio ácido y fenilhidrazina (PH) el glioxilato genera un compuesto coloreado cuyo máximo de absorbancia se da a 520nm. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

### 3.1. *Obtención del extracto vegetal*

Se añadieron 4ml de tampón de extracción por gramo de tejido vegetal. Seguidamente, se homogeneizó con un bastoncillo y se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos. Finalmente, se recogió el sobrenadante que se utilizó como extracto crudo.

**Tampón de extracción:** Tris-HCl 50 Mm, pH 7,8; MnSO<sub>4</sub> 1 mM y DOC 0,15 %.

### 3.2. *Determinación de ureidos totales*

Se diluyeron 50 µl del extracto crudo en 550 µl de agua destilada. A esta dilución se le añadieron 200 µl de NaOH 0.5 N. La mezcla resultante se mantuvo durante 10 min en un baño a 100 °C para transformar la alantoína en alantoato, y seguidamente se incubó 5 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 200 µl de HCl 0,65 N y de

nuevo se incubó a 100 °C durante 10 minutos. Así se transformó el alantoato en glioxilato. Tras otros 5 minutos en hielo, se añadieron 200 µl de tampón fosfato 0,4 N (pH 7) junto con 200 µl de PH al 0,33 % y se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió 1 ml de HCl puro y 200 µl de ferricianuro potásico 1,6 % y se dejó 15 minutos temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 520 nm.

También se midió la absorbancia del blanco de cada muestra. Para ello, se añadieron 50 µl extracto de cada muestra a 950 µl de agua destilada. A continuación, se le añadieron 200 µl de T-P 0,4 N (pH 7) junto con 200 µl de PH al 0,33 % y se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente. Para terminar, previo a la medición de la absorbancia a 520 nm, se añadió 1 ml de HCl puro y 200 µl de ferricianuro potásico 1,6 % y se dejó 15 minutos temperatura ambiente.

### 3.3. *Obtención de la recta de calibrado*

Para la determinación de la concentración total de alantoína utilizamos una recta patrón que reflejaba la transformación de cantidades conocidas de una solución de alantoína 0,2 mM en glioxilato (Tabla 1).

**Tabla 1.** Concentraciones conocidas de la recta de calibrado de alantoína

<b>µl H<sub>2</sub>O</b>	600	500	400	300	200	0
<b>µl Alantoína</b>	0	100	200	300	400	600

### 3.4. *Determinación del contenido en proteína soluble mediante el método de Bradford*

La concentración de ureidos totales se expresó en relación a la cantidad de proteína total soluble contenida en el extracto utilizado en la determinación de ureidos. Para ello se utilizó el método colorimétrico de Bradford (1976). Se realizó de una recta patrón midiendo la absorbancia a 595 nm de 1 ml de reactivo de Bradford con una dilución 1:5 para 0, 1, 2 y 6 µl de BSA.

#### **4. Aislamiento y cuantificación de ácidos nucleicos**

##### **4.1. Extracción de ARN total**

Para la purificación del ARN total se usaron 50-100 mg de muestra, triturada y congelada. A esta cantidad de muestra se le añadió 1 ml de Trizol (Nzyol Nzytech), se homogeneizó con un vórtex y se dejó incubar 5 min a temperatura ambiente. Después, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se agitó y se dejó incubar 8 min. Tras el tiempo de incubación, se centrifugó a 14.000 RPM, a 4 °C y durante 10 min. Se obtuvieron dos fases, una acuosa y otra fenólica. Se recogió la fase acuosa (0,4-0,6ml), la cual contenía el ARN, se pasó a nuevos viables y se le añadió 0,3-0,5ml (0.8v) de 2-Isopropanol. Seguidamente, se agitó y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se centrifugó a 24.000 g, a 4 °C y durante 15 min para precipitar el ARN y se eliminó la fase acuosa. Al ARN precipitado se le añadió 1 ml de etanol al 75% y sin resuspender el pellet, se centrifugó a 14.000 RPM, a 4 °C y durante 5 min. Después, se retiró el etanol, se centrifugó brevemente, y con una pipeta se retiraron cuidadosamente los restos de etanol. El precipitado se resuspendió en 0,2 ml de agua miliQ y se precipitó de nuevo con 133 µl de cloruro de litio (LiCl) 8M, dejándolo “overnight” a 0 °C.

A continuación, se centrifugó a 14.000 RPM a 4 °C, durante 20 min y se eliminó el sobrenadante. Después, se añadió 1ml de etanol al 75% y se centrifugó a 14.000 RPM, a 4 °C, durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el pellet se resuspendió en 40 µl de agua miliQ y se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

##### **4.2. Cuantificación y análisis de la pureza de los ácidos nucleicos**

Para la cuantificación del ARN extraído se midió la absorbancia (A) a 260 nm usando 2 µl de la muestra de ARN aislado, sabiendo que el coeficiente de extinción del ARN es 40 µg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>ml. Por otro lado, la pureza de las muestras se determinó realizando la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. Un cociente 260/230 menor que 2, indica contaminación de naturaleza glucídica. Mientras que el cociente 260/280 menor que 2, indica la presencia de contaminación de naturaleza proteica. Para las medidas se utilizó un espectrofotómetro NANODROP.

#### 4.3. *Electroforesis del ARN aislado*

Con la electroforesis en un gel de agarosa, se comprobó la pureza e integridad de los ácidos nucleicos. Para la separación electroforética del ARN se utilizó un gel de agarosa al 1% con TBE (0,5x). Previo a la electroforesis, se mezcló 1 µl de muestra de ARN aislado con 3 µl de solución de carga de ARN (buffer con BrEt) y se incubó a 58 °C durante 5 min. Transcurridos los 5 min, se realizó la electroforesis a 100 voltios durante 30 min. Una vez acabada la electroforesis, el gel se observó con un transiluminador de luz UV.

**Solución de carga:** formamida desionizada al 62,5% (v/v); formaldehído al 9,25% (v/v); MOPS 1,25x; 50 µg/ml de azul de bromofenol; 50 µg/ml xilencianol y 3 µl de bromuro de etidio (BrEt) en 200 µl totales.

### 5. **Análisis de la expresión génica**

Para el análisis de la expresión se sintetizó ADN copia de cada muestra de ARN total obtenida en cada uno de los experimentos y se siguieron los pasos que se indican a continuación.

#### 5.1. *Tratamiento con ADNasa*

En primer lugar, se eliminó el ADN genómico contaminante en las muestras de ARN. Para ello se mezclaron, 1,5 – 2,5 µg de ARN total con agua miliQ estéril hasta 8 µl. A esta mezcla se le añadió 1 µl del tampón (DNAase buffer) de ADNasa I y 1 µl de ADNasa I (Qiagen). Seguidamente, se incubó a 37 °C durante 10 min. Tras la incubación, se añadió 1 µl de EDTA 50 mM y se volvió a incubar a 75 °C durante 10 min para inactivar la enzima.

#### 5.2. *Síntesis de ADNc*

Para sintetizar el ADNc se mezclaron 8 µl de ARN tratado con ADNasa I, con 7,5 µl de agua miliQ estéril, 4 µl de buffer (5x) y 0,75 µl de la enzima retrotranscriptasa iScript™ (Bio-Rad). Después se incubó a 25 °C durante 5 min, a 40 °C durante 30 min y, finalmente, se calentó a 85 °C durante 5 min para inactivar la enzima.

### 5.3. PCR del gen de la actina

Para verificar que la síntesis de ADNc se realizó correctamente, el ADNc se usó como molde para amplificar el gen constitutivo Actina-2. Para ello, 0,7 µl de ADNc se mezclaron con 4 µl de buffer (5x) GoTaq® (PROMEGA), 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de dNTP, 1 µl de primer directo, 1 µl de primer reverso, 0,1 µl de enzima *GoTaq® G2 Flexi DNA polymerase* (PROMEGA) y agua miliQ hasta tener un total de 20 µl. La reacción de la PCR se hizo incubando a 95 °C durante 3 min; 25 ciclos de 95 °C durante 45 segundos, 37 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos; y 72 °C durante 7 min.

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1 %; TBE (0,5x) y con bromuro de etidio (BrEt) (0,5 µg/ml). Se pusieron 8 µl de muestra por pocillo y 1,5 µl de marcador de masa molecular. Finalmente, la electroforesis se hizo a 100 voltios durante 30 min y el resultado se observó con un transiluminador de luz UV.

**Tabla 2.** Lista de cebadores utilizados en la PCR de actina

GEN USADO	CEBADORES (5' - 3')
<i>PvACT-2</i>	FWR (ACGAGACCACATACAACCTCCATAAT)
	REV (TGCTTCCAGACAAATCATCATAGT)

### 5.4. PCR semicuantitativa

Previo a la realización de la PCR cuantitativa (qPCR), se llevó a cabo una PCR semicuantitativa para determinar cuáles de las cuatro secuencias que codifican posibles isoformas de la proteína NCED estaba regulada por la sequía en judía. El protocolo usado fue el mismo explicado en el apartado 5.3, exceptuando el número de ciclos que en este caso fue de 30. Los cebadores utilizados fueron los citados en la tabla 3.

**Tabla 3.** Lista de cebadores utilizados en la PCR semicuantitativa

GENES USADOS	CEBADORES (5'-3')
<i>PvCCD1</i>	FWR (TGTTGCGGTTGTGGAATTGC)
	REV (TGAGGCAGAACAACACAGTG)
<i>PvNCED1</i>	FWR (AAGGCAAACCCACCCTATGTAG)
	REV (AAGGGAGTTGAAGCCAGAGAAG)
<i>PvNCED3</i>	FWR (GTGGATGTTCGCCATTGGGTTGAG)
	REV (AGCAGGGCGGTTTGAGAATCCAGAG)
<i>PvNCED2</i>	FWR (GTGATGTACGATGGCAAGAAGC)
	REV (GCAGAACATATTTGGCGTCTCC)

#### 5.5. PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR se realizó en un equipo *iCycleriQ* (Bio-Rad), utilizando el reactivo comercial *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) y los cebadores específicos para el gen *PvAct-2*, como control interno, y para los genes *PvPRAT3*, *PvHGPT*, *PvXDH*, *PvNCED3* y *PvMYC2* (Tabla 4). Cada reacción se componía de 8 µl de tampón (2x), 0,32 µl de los cebadores 1 y 2 (1 µM), 1 µl de ADNc previamente diluido 1/3 y 6,36 µl de H<sub>2</sub>O miliQ. El programa que se utilizó consistía en una desnaturalización inicial, junto con la activación de la Taq polimerasa, a 95 °C durante 5 min seguida de 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante otros 30 s y 80 ciclos de 30 s a 60 °C (Livak y Schmittgen, 2001).

**Tabla 4.** Lista de cebadores utilizados para la qPCR

<b>GENES USADOS</b>	<b>CEBADORES (5'-3')</b>
<i>PvAct-2</i> (KF033666.1)	FWR (GGAGAAGATTTGGCATCACACGTT)
	REV (GTTGGCCTTGGGATTGAGTGGT)
<i>PvHGPT</i>	FWR (CGTCACGTCATCTTGGTTGAAGAC)
	REV (AGTGCACACAGAAACAGAGGATGC)
<i>PvMYC2</i>	FWR (GAAAGGGGAATTGGAGAAGC)
	REV (ATCAGCTTGCTCGTCGTTTC)
<i>PvNCED3</i>	FWR (TTAAGGACCTGGCTTCCACATC)
	REV (GTGATGGTGTGTTGGTGTGGAAG)
<i>PvPRAT3</i>	FWR (GTGGATGTTCGCCATTGGGTTGAG)
	REV (AGCAGGGCGGTTTGAGAATCCAGAG)
<i>PvXDH</i>	FWR (GGATTGGTGTGGAACCTCAAGATG)
	REV (GAAGCATTAGGGACCTTGTCAG)

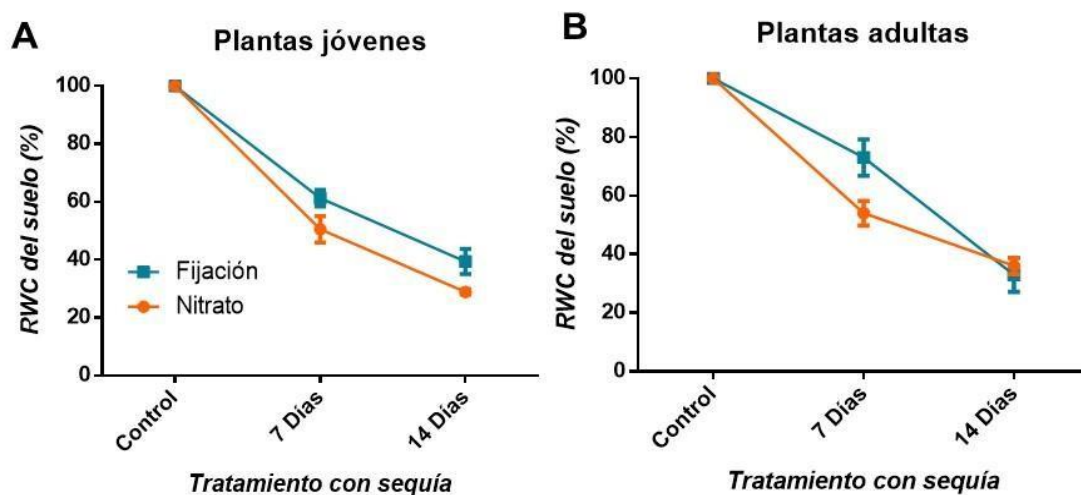
## 6. Análisis estadísticos

Para analizar los resultados se realizó el test 2-way ANOVA, usando el software informático GraphPad Prism 6 utilizando los datos obtenidos de tres experimentos independientes.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Efecto sobre parámetros fisiológicos del déficit hídrico en plantas de judía cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno o fertilizadas con nitrato

Dado que las plantas de judía emplean el nitrógeno simbióticamente fijado en los nódulos para la síntesis de ureidos (Díaz-Leal *et al.*, 2012), y que los ureidos podrían tener un papel protector frente al estrés hídrico (Alamillo *et al.*, 2010), se comparó el efecto de la falta de agua en plantas cultivadas en bajo fijación de nitrógeno o fertilizadas con nitrato. Para ello se utilizaron plantas de 21 días de edad, en las que todavía no se han acumulado ureidos como consecuencia de las tasas máximas de fijación de nitrógeno, que se dan a partir de los 28 días, y plantas de 28 días, que deben de tener niveles elevados de ureidos. En ambos casos se comparó el efecto de la falta de agua en las plantas de fijación con plantas de la misma edad, pero fertilizadas con 10mM de nitrato, y que no habían sido inoculadas con rizobios.



**Fig. 2. Contenido hídrico del suelo (SWC).** (A) Representación de la SWC cuando la sequía es inducida a los 21 días de crecimiento, durante 7 y 14 días. (B) Representación de la SWC cuando la sequía es inducida a los 28 días de crecimiento, durante 7 y 14 días.

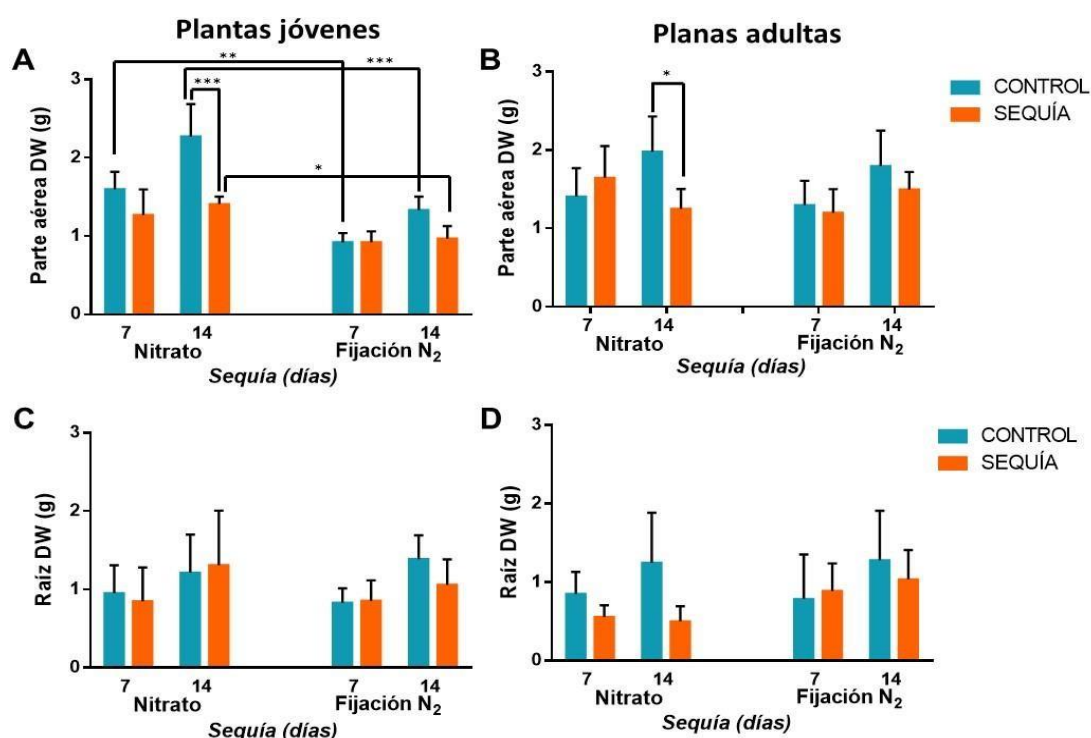
En primer lugar, se midió el contenido hídrico del suelo (SWC) a lo largo del tratamiento. Los resultados observados en la Fig. 2 muestran que las plantas control mantenían prácticamente el 100% de agua. En cambio, en las macetas sometidas a estrés hídrico, el SWC del suelo se veía reducida hasta el 50-60% al séptimo día de



sequía y hasta el 30-40% al decimocuarto día de sequía. El descenso de SWC fue similar bajo condiciones de fijación o aporte de nitrato y entre plantas de 21 días y las de 28 días (Fig. 2A y B), ya que en ningún caso se encontraron diferencias significativas.

### 1.1. Determinación de la biomasa de raíz y de la parte aérea

La determinación de la biomasa de la parte aérea mostró un claro descenso de la biomasa de la parte aérea a los 14 días de sequía en plantas jóvenes con aporte de nitrato (Fig. 3A). Esto también ocurrió en plantas adultas (Fig. 3B). Sin embargo, en plantas fijadoras no se encontraron diferencias significativas entre la biomasa de la parte aérea ni a los 7 ni a los 14 días de sequía en plantas jóvenes o adultas (Fig. 3A y B). Se observó que en los controles de plantas jóvenes había diferencias de biomasa aérea entre plantas fijadoras y plantas tratadas con nitrato (Fig. 3A). En cambio, en plantas adultas no hubo diferencias entre la biomasa aérea de plantas control con nitrato y fijadoras (Fig. 3B).



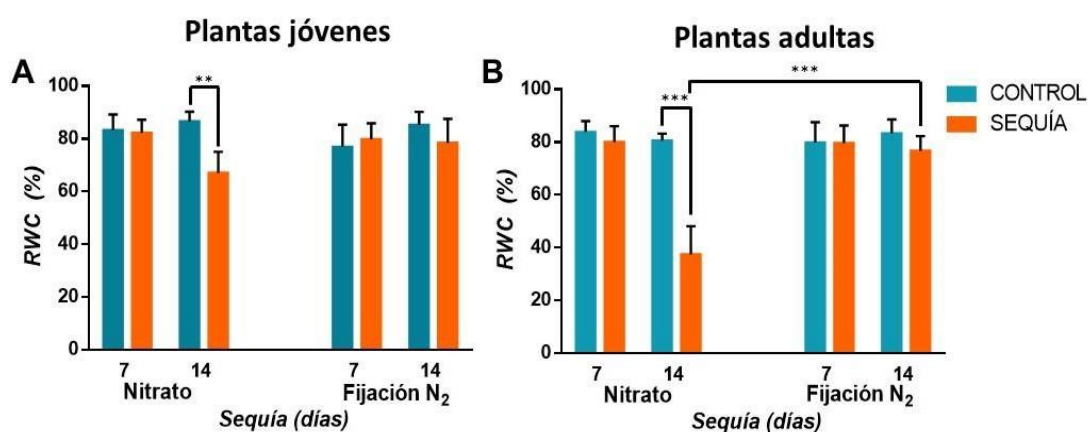
**Fig. 3. Determinación de la biomasa de raíz y parte aérea.** (A) Biomasa de la parte aérea en plantas de *P. vulgaris* con aporte de nitrato 10 mM y fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 21 días de crecimiento, durante 7 y 14 días. (B) Biomasa de la parte aérea en plantas de *P. vulgaris* con aporte de nitrato 10 mM y fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 28 días de crecimiento, durante 7 y 14 días. (C) Biomasa de la raíz en plantas de *P. vulgaris* con aporte de nitrato 10 mM y fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 21 días de crecimiento, durante 7 y 14 días. (D) Biomasa de la raíz en plantas de *P. vulgaris* con aporte de nitrato 10 mM y fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 28 días de crecimiento, durante 7 y 14 días. Las gráficas son el resultado de los datos obtenidos de tres experimentos independientes. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ )

En la determinación de la biomasa de raíz de plantas jóvenes y adultas, no se obtuvieron diferencias significativas ni entre plantas control y tratadas, ni entre plantas fijadoras y las tratadas con nitrato (Fig. 3C y D).

## 12. Análisis del contenido relativo de agua (RWC) en hojas

La determinación del RWC en hojas (Fig. 4) mostró que, tanto en plantas jóvenes como en adultas en simbiosis, dicho RWC apenas se veía afectado por la sequía. Contrariamente, en plantas jóvenes cultivadas con nitrato se observó un descenso del RWC con respecto a las plantas control a los 14 días de sequía (Fig. 4A). Además, dicho descenso se acusaba más en plantas adultas (Fig. 4B), con resultados más significativos ( $p < 0.0001$ ).

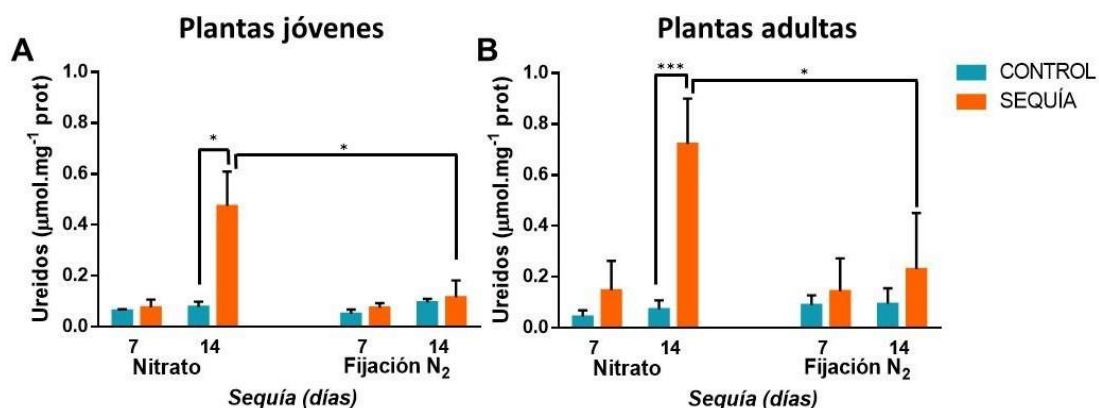
En cuanto a la comparación del RWC entre plantas jóvenes tratadas con nitrato y plantas fijadoras, no se observaron diferencias significativas. Por el contrario, en plantas adultas sí se apreciaron diferencias significativas entre en el RWC de hojas a los 14 días de sequía entre plantas tratadas con nitrato y plantas fijadoras (Fig. 4B). Es decir, las plantas fijadoras tenían mayor capacidad de mantener el contenido hídrico durante la sequía que las plantas con nitrato.



**Fig. 4.** Análisis del contenido relativo de agua (RWC) de hojas. (A) RWC de hojas de plantas de *P. vulgaris* con aporte de nitrato 10 mM y fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 21 días de crecimiento durante 7 y 14 días. (B) RWC de hojas de plantas de *P. vulgaris* con aporte de nitrato 10 mM y fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 28 días de crecimiento durante 7 y 14 días. (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ )

## 2. Determinación de ureidos totales

Los resultados de la figura 5A muestran que, a 14 días de sequía, se indujo la acumulación de ureidos en plantas jóvenes de nitrato 10mM. Este resultado se hizo todavía más significativo en plantas adultas (Fig. 5B). Sin embargo, en plantas noduladas el incremento en la acumulación de ureidos fue menor, no llegando a ser significativo con respecto a su control.



**Fig. 5.** Determinación de ureidos totales en 4ª hoja trifoliada de plantas de *P. vulgaris*. (A) Determinación de ureidos totales en plantas de *P. vulgaris* tratadas con nitrato 10mM y en fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 21 días, durante 7 y 14 días. (B) Determinación de ureidos totales en plantas de *P. vulgaris* tratadas con nitrato 10mM y en fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 28 días, durante 7 y 14 días. Las gráficas son el resultado de los datos obtenidos de tres experimentos independientes. (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ )

También, se observaron diferencias en la acumulación de ureidos durante la sequía entre plantas tratadas con nitrato y fijadoras, adultas y jóvenes. Es decir, la acumulación de ureidos producida a los 14 días de sequía era mayor en plantas tratadas con nitrato que plantas simbióticas (Fig. 5A y B).

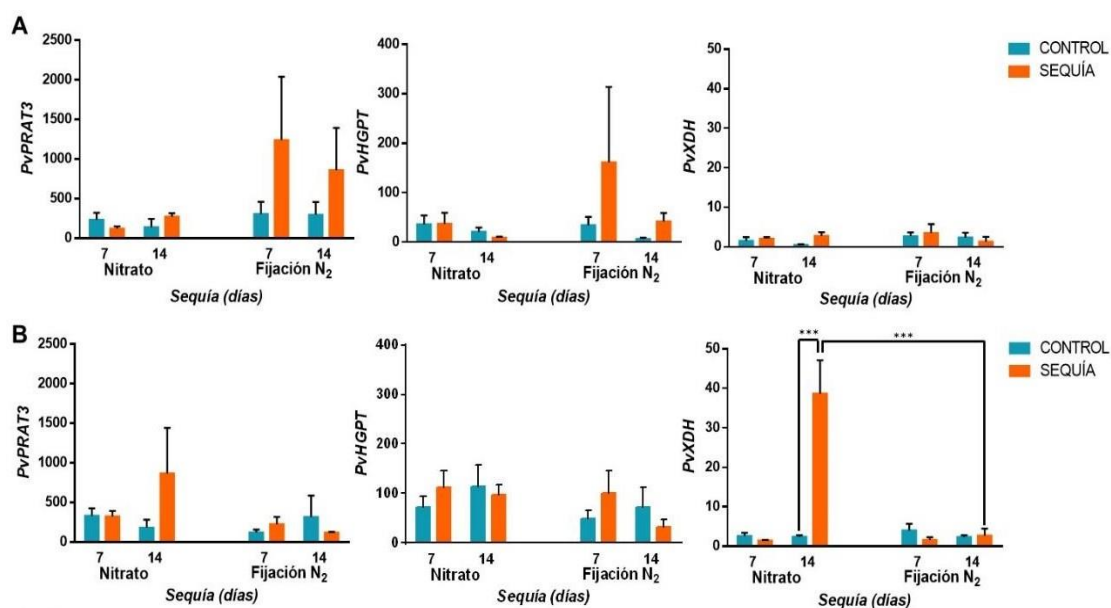
## 3. Análisis de la expresión génica

### 3.1 Análisis de expresión por qPCR de los genes relacionados con la síntesis de ureidos

Con el fin de dilucidar la procedencia de los ureidos acumulados durante la sequía, se analizó el nivel de expresión de los genes *PvPRAT3*, implicado en la síntesis de nucleótidos, *PvXDH*, implicado en la degradación de los nucleótidos para sintetizar ureidos y de *PvHGPT*, implicado en el reciclaje de nucleótidos. Dado que los parámetros fisiológicos analizados previamente se veían afectados de la misma forma en plantas jóvenes y adultas, pero con mayor intensidad en estas últimas, se estudió el nivel de expresión de los genes sólo en tejidos de raíz y 4ª hoja trifoliada de plantas

fijadoras y tratadas con nitrato 10mM a las que se les indujo sequía a los 28 días de edad. Los resultados (Fig. 6A) mostraron que, en raíz, la expresión de la *PvXDH* y *PvHGPT* se mantenía estable tanto en sequía como en riego y en las diferentes condiciones de aporte de nitrato. Sin embargo, la expresión de *PvPRAT3* de plantas en sequía, sufrió una ligera inducción a los 7 y 14 días de sequía, tanto bajo condiciones de nitrato como en fijación. A pesar de las ligeras diferencias apreciadas, los resultados no llegaban a ser significativos.

La expresión de los genes *PvPRAT3* y *PvHGPT* tampoco mostraron diferencias significativas en las hojas de plantas de nitrato y de fijación (Fig. 6B). En cambio, se apreció una fuerte inducción de *PvXDH* a 14 días de sequía en hojas de las plantas con nitrato. También, se apreciaron diferencias significativas en la expresión de *PvXDH* entre plantas tratadas con nitrato y fijadoras con sequía inducida durante 14 días. Por tanto, es la degradación de los nucleótidos purínicos, representada por la inducción de la XDH y no la síntesis *de novo*, o el reciclaje la que se ve inducida por la sequía.

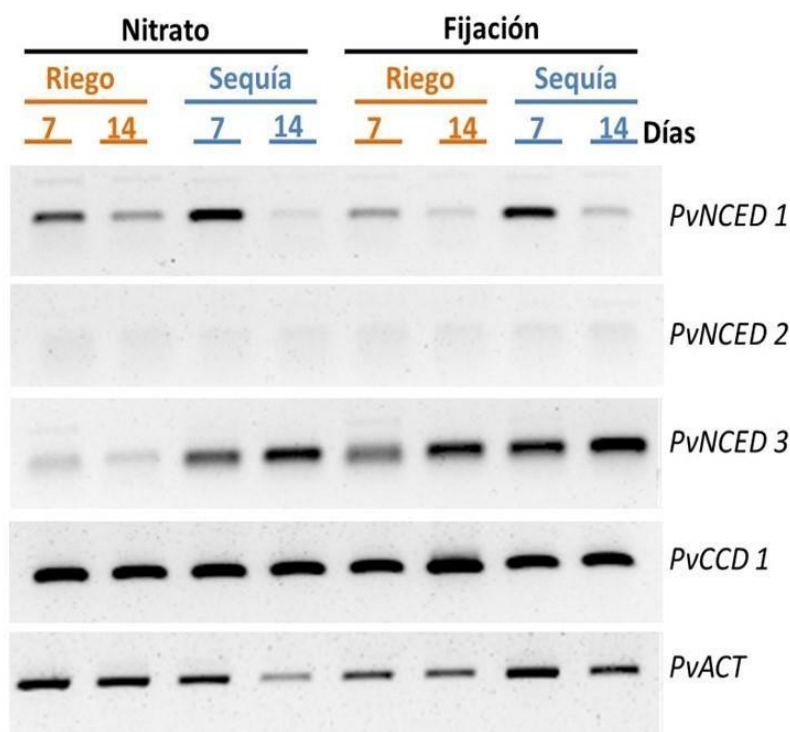


**Fig. 6.** Expresión relativa de genes implicados en las rutas de biosíntesis de ureidos en plantas de *P. vulgaris*. (A) Expresión relativa de *PvPRAT3*, *PvHGPT* y *PvXDH* en raíz de plantas tratadas con nitrato 10 mM y en fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 28 días de crecimiento durante 7 y 14 días. (B) Expresión relativa de *PvPRAT3*, *PvHGPT* y *PvXDH* en hoja de plantas tratadas con nitrato 10 mM y en fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a los 28 días de crecimiento durante 7 y 14 días. Las gráficas son el resultado de los datos obtenidos de tres experimentos independientes. (\*\*\*)*p*<0.0001

### 3.2 Análisis de expresión por PCR semicuantitativa de genes *PvNCED* en hojas de *P. vulgaris*

Para ver si la mayor capacidad de retención de agua en las hojas de fijación está relacionada con diferencias en la síntesis de ABA en las plantas de fijación y nitrato, se

medió la expresión del gen NCED. Esta es la enzima que media el paso clave en la síntesis de ABA. En *P. vulgaris* se han detectado 4 secuencias homólogas a NCED. De ellas tres codifican genes con alta homología a NCED implicadas en la síntesis de ABA y el cuarto gen corresponde a otra dioxigenasa de carotenoides (CCD1), implicada en la síntesis de estrigolactonas, pero no en la de ABA. Ninguno de estos genes se ha estudiado antes en judía. Mediante una PCR semicuantitativa, se analizó la expresión de los cuatro genes homologos a NCED para determinar cuál está regulado por la sequía en hojas de judía. Los resultados obtenidos mostraron que mientras *PvNCED2* y *PvCCD1* no variaban su expresión, *PvNCED1* y 3 sí veían su expresión afectada por el estrés hídrico (Fig. 7). La expresión de *PvNCED1* se indujo a 7 días de sequía tanto en plantas de nitrato como de fijación. Sin embargo, a 14 días de sequía no se apreciaban diferencias con respecto a su control. En cambio, la expresión de *PvNCED3* sí que aumento claramente tanto en las plantas de nitrato como fijadoras, en respuesta a 7 y 14 días de sequía con respecto a su control. Además, se apreció que en muestras control de fijación la expresión de dicho gen era mayor que en las muestras de nitrato.

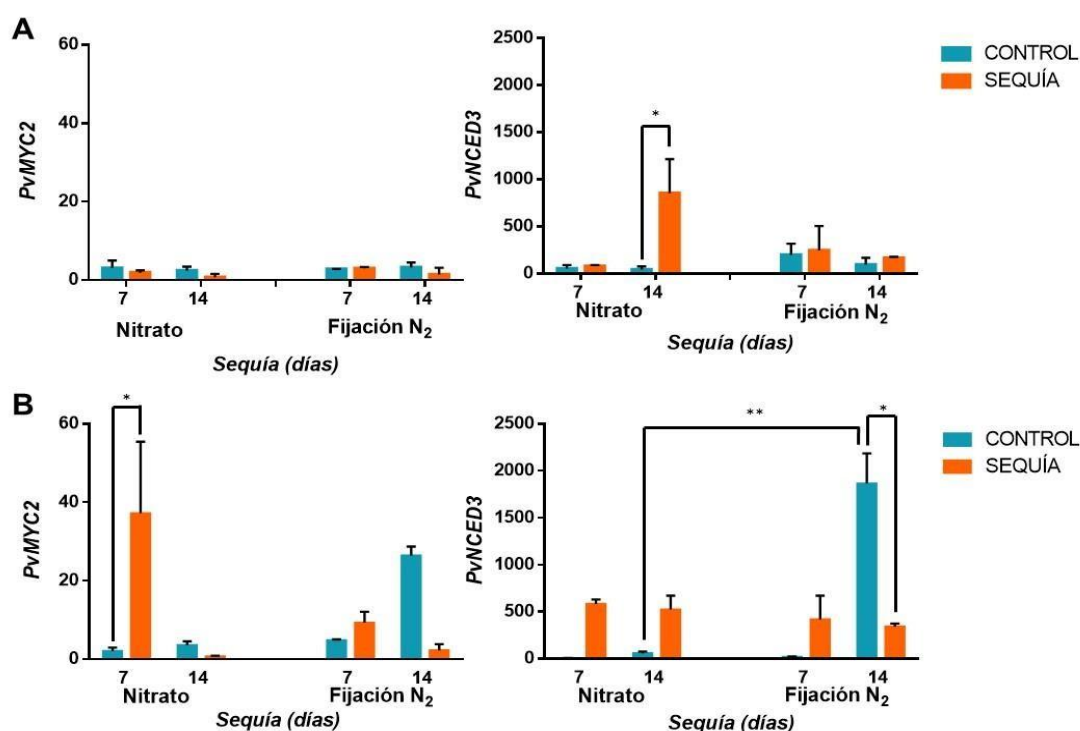


**Fig. 7. Análisis de la expresión de los genes *PvNCED* de *P. vulgaris*.** Representación de los resultados por PCR semicuantitativa de la expresión de las 3 isoformas del gen *PvNCED* y del gen *CCD1* también homólogo a NCED en hojas de *P. vulgaris* tratadas con nitrato 10 mM y en fijación de N<sub>2</sub>, con sequía inducida a 28 días de crecimiento durante 7 y 14 días

### 3.3 Análisis de expresión por qPCR de genes relacionados con la expresión de ABA

Recientemente en *Arabidopsis* se ha visto que el ureido alantoína induce la síntesis de ABA e interacciona con el factor de transcripción MYC2 para regular la tolerancia al estrés (Watanabe *et al.*, 2014; Takagi *et al.*, 2016). Para comprobar si la mayor capacidad de retención de agua de las plantas fijadoras podría estar relacionada con estos resultados, se midió la expresión de los genes *PvNCED3* y *PvMYC2* mediante qPCR en las plantas de fijación y nitrato sometidas a sequía. En tejidos de raíz (Fig. 8A) se observó que en plantas fijadoras la expresión de ambos genes se mantenía constante en sequía y en riego. Sin embargo, en plantas con nitrato, la expresión de *PvNCED3* se inducía a 14 días de sequía, mientras que *PvMYC2* no varió su nivel de expresión.

En los resultados del análisis en hoja (Fig. 8A), se observó que en plantas con nitrato, *PvMYC2* sufrió una inducción significativa en su expresión a 7 días de sequía. Mientras, la expresión de *PvNCED3* aumentó a 7 y 14 días de sequía, aunque no significativamente. Sin embargo, en plantas simbióticas la expresión de *PvNCED3* aumentó significativamente a los 7 días de sequía y disminuyó a los 14 días.



**Fig. 8. Expresión relativa de los genes relacionados con la expresión de ABA en plantas de *P. vulgaris*.** (A) Expresión de *PvMYC* y *PvNCED* en raíz de plantas tratadas con nitrato 10 Mm y en fijación de  $N_2$ , con sequía a 28 días de crecimiento durante 7 y 14 días. (B) Expresión de *PvMYC* y *PvNCED* en hoja de plantas tratadas con nitrato 10 Mm y en fijación de  $N_2$ , con sequía a 28 días de crecimiento durante 7 y 14 días. Las gráficas son el resultado de los datos obtenidos de tres experimentos independientes. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ).

Por otra parte, el gen *PvNCED3* se expresaba más en el control de plantas fijadoras que en su control homólogo de plantas con nitrato. Es decir, *PvNCED3* se expresa más en condiciones de riego en plantas fijadoras que en plantas con nitrato.



## V. DISCUSIÓN

Las leguminosas ofrecen una gran ventaja agrícola ya que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, lo que permite reducir el uso de fertilizantes nitrogenados y aumentar la fertilidad del suelo (Brockwell *et al.*, 1995; Gentzbittel *et al.*, 2015; Sprent, 2002). Sin embargo, esta capacidad se ve reducida por factores como la sequía y el aporte de fertilizantes nitrogenados (Serraj *et al.*, 1999, Purcell *et al.*, 2004). La sequía inhibe la fijación de  $N_2$  en leguminosas, pero también induce mecanismos de protección frente a la falta de agua en la planta, como la síntesis de ABA y de ureidos.

En este trabajo se observó que la biomasa de raíz no se veía afectada por la sequía ni en plantas de fijación ni de nitrato (Fig. 3C y D). Sin embargo, sí que se apreciaron diferencias significativas en la biomasa de la parte aérea de las plantas con aporte de nitrato (Fig. 3A y B). Es decir, con nitrato, la biomasa aérea en condiciones de sequía se veía reducida con respecto a la biomasa de condiciones control. Esto coincide con el hecho de que las células vegetales frenan su expansión rápidamente, sobre todo en las hojas, como consecuencia de la falta de agua. Sin embargo, curiosamente, las plantas fijadoras no variaron su biomasa aérea con respecto al control (Fig. 3A y B).

Varios estudios han relacionado la acumulación de ureidos durante la sequía con la pérdida de la capacidad de fijación de  $N_2$  y con la sensibilidad a la sequía. De manera que, una menor acumulación de ureidos podría traducirse en un aumento de tolerancia a la sequía (King y Purcell, 2001; 2005; Purcell *et al.*, 2000; Serraj *et al.*, 1999, 2001; Vadez *et al.*, 2000). En consonancia con estos datos, los resultados de la figura 5, con mayor acumulación de ureidos a 14 días de sequía en plantas con aporte de nitrato que en las de fijación, indicarían que las primeras son menos tolerantes al estrés que las de fijación. Por otro lado, se sabe que, en ausencia de estrés, los ureidos se sintetizan mayoritariamente en leguminosas fijadoras de  $N_2$ . En cambio, cuando hay aporte de nitrato en el riego, los ureidos se sustituyen por glutamina y asparragina (Díaz-Leal *et al.*, 2012; McClure e Israel, 1979; Pate *et al.*, 1980). En la figura 5 se aprecia que, aunque las plantas con nitrato durante el riego tienen ureidos, tienen menos que las plantas fijadoras. Este hecho podría relacionarse con la conservación del contenido



hídrico en el tejido foliar durante la sequía en plantas fijadoras (Fig. 4) y sugeriría que los ureidos existentes antes del estrés ayudarían a proteger a las plantas fijadoras de la pérdida de agua durante la sequía, bien actuando como osmolitos, o a través de otros mecanismos. A 14 días de sequía la acumulación de ureidos aumenta en plantas fijadoras, pero no tanto como en las de nitrato, sugiriendo de nuevo que son menos sensibles a la sequía. Este resultado estaría de acuerdo con las diferencias de reducción del RWC en hojas entre las plantas de fijación y de nitrato, ya que son mayores en plantas más adultas que en las jóvenes, que tienen contenidos menores de ureidos debido a que la fijación de nitrógeno aún no ha alcanzado su tasa máxima, que ocurre a partir de los 28 días (Díaz-Leal *et al.*, 2012).

Los ureidos proceden del catabolismo oxidativo de las purinas, y estas a su vez pueden surgir por la ruta de síntesis *de novo* o bien de la degradación o “turnover” de los ácidos nucleicos (Schubert, 1986). Para dilucidar como se originan los ureidos acumulados en respuesta a la sequía, se analizó la expresión relativa de los genes clave en las rutas de síntesis de ureidos. En los resultados representados en la figura 7B, donde se representa la expresión de los genes *PvXDH*, *PvPRAT3* y *PvHGPT* en hojas, se comprobó que las plantas con nitrato hubo una inducción significativa ( $p>0.05$ ) del gen *PvXDH*, mientras que *PvPRAT3* y *PvHGPT* no mostraron diferencias con respecto al control. La inducción de *PvXDH*, que inicia la degradación de las purinas, pero no de *PvPRAT3*, responsable de la síntesis del primer intermediario de la ruta de síntesis *de novo*, sugiere que los ureidos acumulados en las plantas de nitrato durante la sequía provienen mayoritariamente de la ruta de degradación de ácidos nucleicos. Las purinas procedentes de la degradación de los ácidos nucleicos podrían recuperarse para volver a formar nucleótidos, y no ureidos, pero la ausencia de cambios significativos en la expresión de *PvHGPT* (Fig.7), gen que sintetiza la enzima de reciclaje, indica que el reciclaje tiene poca relevancia en la modulación de las cantidades de ureidos en estas condiciones.

La síntesis de ABA es uno de los primeros efectos de la falta de agua en plantas, y con ella las cascadas de transducción de señales que inducen la expresión de diversos genes relacionados con la protección frente a la sequía. De todas las proteínas que participan, la NCED cataliza una etapa clave en la biosíntesis de ABA (Fig. 1). Los genes

que codifican esta proteína han sido identificados en diversas especies. En *Arabidopsis* se han identificado hasta nueve isoformas que codifican NCED, de las cuales 5 participan en la síntesis de ABA (Luchi *et al.*, 2001). Mediante PCR semicuantitativa se comprobó que *PvNCED3* de *P. vulgaris* era la principal isoforma expresada durante el estrés hídrico en hoja (Fig. 6). Esto concuerda con los resultados de Luchi *et al* (2001), para la isoforma homóloga en *Arabidopsis*. Sin embargo, los *PvNCED2* y *PvCCD1* no varían su expresión por la sequía. Sí se indujo la expresión de *PvNCED1* a 7 días de sequía, aunque menos que *PvNCED3*. Aun así, *PvNCED1* también podría contribuir parcialmente a la síntesis de ABA. No obstante, como *PvNCED3* mostró una respuesta mayor, se analizó su expresión mediante qPCR en respuesta a el estrés hídrico en las plantas fijadoras y de nitrato. En este análisis se confirmó que tanto en raíces como en hojas había una clara inducción de la expresión de *PvNCED3* en plantas con nitrato a 7 y 14 días de sequía. En cambio, las plantas fijadoras no mostraron diferencias significativas con respecto su control (Fig. 8). A pesar de esto, sí que se apreció una mayor expresión de *PvNCED3* en el control de plantas fijadoras con respecto el control de plantas con nitrato, sobre todo en hojas (Fig. 8B). Esto sugiere que habría una mayor expresión de ABA en plantas fijadoras que en plantas tratadas con nitrato durante las condiciones de riego y, por tanto, las plantas fijadoras podrían reaccionar más rápido ante la falta de agua. Es decir, el ABA podría desencadenar con antelación la activación de respuestas frente al estrés hídrico, como es el cierre estomático, para evitar la pérdida de agua en plantas fijadoras. Esto explicaría el mayor contenido hídrico en hojas de plantas fijadoras (Fig. 4).

Finalmente, el análisis de la expresión del gen *PvMYC2* relacionado con las respuestas dependientes de ABA de protección frente a la sequía, mostró que en hoja había una mayor expresión a 7 días de sequía con respecto el control y disminuía a 14 (Fig. 8B). Esto ocurría tanto en plantas con nitrato como fijadoras. MYC2 es un factor de transcripción que a su vez induce la expresión de otros genes de respuesta al estrés hídrico. Por tanto, es de esperar que se induzca como respuesta temprana y después desaparezca parcialmente. No obstante, también este gen mostraba niveles más elevados en los controles de fijación que en los de nitrato, por lo que, parece que la respuesta al ABA se encuentra ya activada en plantas fijadoras de judía. Esto coincidiría

con el efecto de la alantoína descrito en *Arabidopsis* (Watanabe *et al.*, 2014; Takagi *et al.*, 2016), y confirmaría que los ureidos que sintetizan las plantas de fijación las hace más resistentes a la pérdida de agua en condiciones de sequía. Estos resultados podrían tener gran relevancia en la agricultura, ya que, a las enormes ventajas de la fijación de nitrógeno, con la consabida reducción en fertilizantes, se une que las plantas tolerarían mejor las condiciones de sequía moderada.

## VI. CONCLUSIONES

1. Las plantas de *P. vulgaris* crecidas bajo fijación simbiótica de nitrógeno retienen más agua y son menos afectadas por la sequía que las plantas fertilizadas con nitrato.
2. Los ureidos acumulados bajo estrés hídrico en *P. vulgaris* no se producen a partir de purinas sintetizadas *de novo*, ni por vías de salvamento nucleotídicas, sino por el aumento del reciclaje de ácidos nucleicos y la inducción del catabolismo de las purinas.
3. El alto nivel de expresión del gen de biosíntesis de ABA, *PvNCED3*, en hojas de plantas simbióticas durante el riego podría explicar la mayor capacidad de retención de agua en sus hojas.
4. La simbiosis con rizobios parece promover la tolerancia a la sequía, a pesar de la conocida sensibilidad a la sequía de la fijación de nitrógeno.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., and Shinozaki, K. (1997). Role of MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9:1859–1868.
2. Alamillo JM., Díaz-Leal JL., Sánchez-Morán V., Pineda M. (2010) Molecular analysis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell and Environment*. 33:1-9.
3. Atkins C.A. (1991) Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. In Dilworth M. and Glenn A. (eds.) *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*: 293-319. Elsevier, Amsterdam.
4. Barrs H.D., Weatherly P.E. (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal Biological Sciences* 15:413-428.
5. Beebe S.E. (2012). Common bean breeding in the tropics. *Plant Breeding Review* 36:357–426.
6. Beebe S.E., Rao I.M., Blair M.W., Acosta-Gallegos J.A. (2013) Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in Physiology* 4:35.
7. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
8. Brockwell J., Bottomley P.J., Thies J.E. (1995) Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant and Soil* 174:143-180.
9. Broughton W.J., Hernández G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* 252:55–128.
10. Brychkova G., Alikulov Z., Fluhr R., Sagi M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. *Plant Journal* 54:496-509.
11. Charlson D.V., Korth K.L., Purcell L.C. (2009) Allantoate amidohydrolase transcript expression is independent of drought tolerance in soybean. *Journal of Experimental Botany* 60:847-851.

12. Coletto I., Pineda M., Rodinño AP., De Ron AM. and Alamillo JM. (2014) Comparison of inhibition of N<sub>2</sub> fixation and ureide accumulation under water deficit in four common bean genotypes of contrasting drought tolerance. *Annals of Botany*. 113:1071–1082, 2014
13. Díaz-Leal J., Gálvez-Valdivieso G., Fernández J., Pineda M. and Alamillo JM. (2012). Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation of allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*. 63:4095-4106
14. Farquhar G. D. & Sharkey T. D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review Plant Biology* 61:561–591.
15. Gentzbittel L., Andersen S.U., Ben C., Rickauer M., Stougaard J., Young N.D. (2015) Naturally occurring diversity helps to reveal genes of adaptive importance in legumes. *Frontiers in Plant Science* 6:269.
16. Graham P.H., Vance C.P. (2003) Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* 131(3):872-7.
17. Jones H. G. & Sutherland R. A. (1991). Stomatal control of xylem embolism. *Plant Cell Environment* 11:111–121.
18. King C.A., Purcell L.C. (2001). Soybean nodule size and relationship to nitrogen fixation response to water deficit. *Crop Science* 31:1376-1378.
19. King C.A, Purcell L.C. (2005). Inhibition of N<sub>2</sub> fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiology* 137:1389–1396.
20. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
21. Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase: a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 27:325–333.
22. McClure P.R., Israel D.W. (1979). Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology* 64:411-416.
23. Nakagawa A., Sakamoto S., Takahashi M., Morikawa H., Sakamoto A. (2007). The RNAi-mediated silencing of xanthine dehydrogenase impairs growth and fertility

- and accelerates leaf senescence in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant and Cell Physiology* 48:1484-1495.
24. Pate J.S., Atkins C.A., White S.T., Rainbird R.M., Woo K.C. (1980). Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiology* 65:961-965.
  25. Purcell L.C., King C.A., Ball R.A. (2000) Soybean cultivar differences in ureides and the relationship to drought tolerant nitrogen fixation and manganese nutrition. *Crop Science* 40:1062-1070.
  26. Purcell L.C., Serraj R., Sinclair T.R. & De A. (2004) Soybean N<sub>2</sub> fixation estimates, ureide concentration, and yield responses to drought. *Crop Science* 44:484-492.
  27. Roychoudhury A., Paul S., Basu S. (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Report* 32:985-1006.
  28. Schubert K.R. (1986). Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 37:539-574.
  29. Serraj R., Vadez V., Denison R.F., Sinclair T.R. (1999). Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiology* 119:289-296.
  30. Serraj R., Vadez V., Sinclair T.R. (2001). Feedback regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation under drought stress. *Agronomie* 21:621-626.
  31. Sprent J. (2002) Knobs, knots and nodules—the renaissance in legume symbiosis research. *New Phytologist* 153:2-6.
  32. Takagi H., Ishiga Y., Watanabe S., Konishi T., Egusa M., Akiyoshi N., Matsuura T., Mori I.C., Hirayama T., Kaminaka T., Shimada H., Sakamoto A. (2016) Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* 67: 2519-2532.
  33. Todd C.D, Tipton P.A, Blevins D.G., Piedras P., Pineda M., Polacco J.C. (2006) Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany* 57:5-12.
  34. Tuteja N. (2007). Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling and Behaviour*. 2:135-138.

35. Vadez V., Sinclair T.R. (2001). Leaf ureide degradation and N<sub>2</sub> fixation tolerance to water deficit in soybean. *Journal of Experimental Botany* 52:153-159.
36. Vadez V., Sinclair T., Serraj R. (2000). Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N<sub>2</sub> fixation in soybean. *Physiologia Plantarum* 110:215–223.
37. Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N., Yadav G., Singh J., Mishra R.K., Kumar V., Verma R., Upadhyay R.G., Pandey M., Sharma S. (2017). Absciscic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current knowledge and Futures Prospects. *Frontiers in plant science* 8:161.
38. Vogels G., Van der Drift C. (1970) Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry* 33:143-157.
39. Watanabe S., Matsumoto M., Hakomori Y., Takagi H., Shimada H., Sakamoto A. (2014). The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell and Environment* 37:1022–1036.
40. Zhang D. (2014). Absciscic Acid: Metabolism, Transport and Signaling. *New York, NY: Springer*.
41. Zrenner R., Stitt M., Sonnewald U., Boldt R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57:805-836.